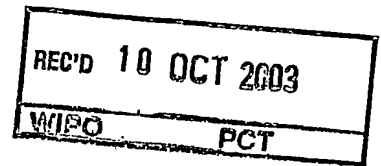


PCT/JP03/10541

20.08.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年 8月30日

出願番号  
Application Number: 特願2002-253752  
[ST. 10/C]: [JP2002-253752]

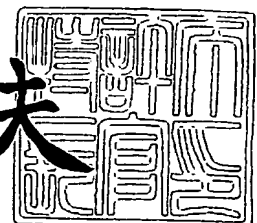
出願人  
Applicant(s): 早出 広司  
アークレイ株式会社  
ユニチカ株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月26日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P14-294830  
【提出日】 平成14年 8月30日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/53  
C12N 15/78  
【発明の名称】 グルコース脱水素酵素の製造方法  
【請求項の数】 15

## 【発明者】

【住所又は居所】 東京都目黒区南 1 - 1 3 - 1 6

【氏名】 早出 広司

## 【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会社内

【氏名】 山岡 秀亮

## 【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会社内

【氏名】 星島 光博

## 【発明者】

【住所又は居所】 京都府宇治市宇治小桜 2 3 番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

【氏名】 黒坂 啓介

## 【発明者】

【住所又は居所】 京都府宇治市宇治小桜 2 3 番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

【氏名】 川瀬 至道

## 【特許出願人】

【識別番号】 596153357  
【住所又は居所】 東京都目黒区南 1-13-16  
【氏名又は名称】 早出 広司

## 【特許出願人】

【識別番号】 000141897  
【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 57  
【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

## 【特許出願人】

【識別番号】 000004503  
【住所又は居所】 兵庫県尼崎市東本町 1 丁目 50 番地  
【氏名又は名称】 ユニチカ株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100086380  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 吉田 稔  
【連絡先】 06-6764-6664

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100103078  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 田中 達也

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100105832  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 福元 義和

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100117167  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 塩谷 隆嗣

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100117178

【弁理士】

【氏名又は名称】 古澤 寛

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 024198

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0103432

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 に記載するグルコース脱水素活性を有する  $\alpha$  サブユニットおよび電子伝達タンパク質である  $\beta$  サブユニットをコードする配列を含む DNA を、シュードモナス属に属する微生物に導入して形質転換体を形成し、この形質転換体を培養して、前記  $\beta$  サブユニットを含む第 1 のグルコース脱水素酵素と、前記  $\beta$  サブユニットを含まない第 2 のグルコース脱水素酵素とを産生させることを特徴とする、グルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 2】 前記  $\alpha$  サブユニットは、還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 60 kDa であり、

前記  $\beta$  サブユニットは、還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 43 kDa である、請求項 1 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 3】 前記 DNA は、還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約 14 kDa である  $\gamma$  サブユニットをコードする塩基配列を含んでおり、

前記第 1 および第 2 グルコース脱水素酵素は、前記  $\gamma$  サブユニットを含むものとして産生される、請求項 1 または 2 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 4】 前記シュードモナス属に属する微生物は、シュードモナス・プチダである、請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 5】 前記 DNA は、ブルクホルデリア属に属する微生物であって、グルコース脱水素酵素を産生する能力を有する微生物から取得したものである、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 6】 前記ブルクホルデリア属に属する微生物は、ブルクホルデリア・セパシア KS1 株 (FERM BP-7306) である、請求項 5 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 7】 前記  $\alpha$  サブユニットは、配列番号 3 のアミノ酸配列、または配列番号 3 のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有している、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 8】 前記 DNA は、配列番号 1 の塩基配列のうち、塩基番号 764～2380 からなる  $\alpha$  サブユニットをコードする塩基配列を含んでいる、請求項 7 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 9】 前記  $\beta$  サブユニットは、配列番号 5 のアミノ酸配列、または配列番号 5 のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有している、請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 10】 前記 DNA は、配列番号 1 のうち、塩基番号 2386～3660 からなる  $\beta$  サブユニットをコードする塩基配列を含んでいる、請求項 9 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 11】 前記  $\gamma$  サブユニットは、配列番号 2 のアミノ酸配列、または配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有している、請求項 2 ないし 10 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 12】 前記 DNA は、配列番号 1 の塩基配列のうち、塩基番号 258～761 からなる  $\gamma$  サブユニットをコードする塩基配列を含んでいる、請求項 11 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 13】 前記 DNA は、前記  $\beta$  サブユニットのシグナルペプチドをコードする塩基配列を含んでいる、請求項 1 ないし 12 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 14】 前記シグナルペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号 1～22 のアミノ酸配列を有している、請求項 13 に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 15】 前記シグナルペプチドは、配列番号 1 の塩基配列のうち、塩基番号 2386～2451 の塩基配列によりコードされる、請求項 14 に記載

のグルコース脱水素酵素の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グルコース脱水素酵素の製造方法に関する。この製造方法により得られるグルコース脱水素酵素は、たとえばグルコースセンサなどに使用できるものである。

【0002】

【背景の技術】

特定の基質に対して特異的に反応する酵素を用いたバイオセンサの開発は、産業の分野を問わず盛んに行われている。その代表的なものとして、主に医療分野で使用されるグルコースセンサが挙げられる。

【0003】

グルコースセンサは、酵素と電子伝達物質を含む反応系を構築するためのものであり、このグルコースセンサを利用する場合には、たとえばアンペロメトリックな手法を用いてグルコースが定量される。酵素としては、グルコースオキシダーゼ（GOD）やグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）が使用されている。

【0004】

GODは、グルコースに対する基質特異性が高く、熱安定性に優れており、酵素の量産化が可能であるために生産コストが他の酵素と比べて安価であるといった利点がある。その反面、GODを使用した系は、測定サンプル中の溶存酸素の影響を受けやすいため、溶存酸素が測定結果に影響を及ぼすといった問題がある。

【0005】

一方、GDHを使用した系は、測定サンプル中の溶存酸素の影響を受けにくい。このため、GDHを使用した系は、酸素分圧が低い環境下で測定を行ったり、酸素量が多く要求される高濃度サンプルを測定する場合であっても、精度よくグルコース濃度を測定することができる。その反面、GDHは、熱安定性が悪く、基質特異性がGODよりも劣るといった問題点がある。

## 【0006】

このような事情から、GODとGDHの双方の欠点を補う酵素が模索されていた。本発明者の一人である早出は、国際公開WO02/36779号公報に開示したように、温泉付近の土壌から新規菌株（ブルクホルデリア・セパシアKS1株）を分離し、この菌株から新しいGDHを取得した。このGDHは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットからなるものであり（以下「CyGDH」という）、電子伝達物質との反応速度が高く、耐熱性の面でも問題がないものであり、グルコースセンサ用としては好適なものであった。

## 【0007】

しかしながら、KS1株では、CyGDHの生産性が悪いため、工業的な応用を考えた場合にはKS1株によるCyGDHの量産化は困難である。そこで、本発明者らは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットをコードするDNAを大腸菌に導入して発現させたところ、効率良くGDHが産生された。ところが、このGDHは、 $\alpha$ 、 $\gamma$ サブユニットからなるものであり、 $\beta$ サブユニットが欠落したものであった（以下「 $\alpha$ GDH」という）。このように、大腸菌を形質転換する方法では、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの全てを発現させることができなかった。

## 【0008】

本発明者らはさらに、 $\alpha$ GDHの特性について調べたところ、 $\alpha$ GDHは、CyGDHに比べて電子伝達物質との反応速度が小さいものの、CyGDHよりも耐熱性が高く、グルコースに対するKmが小さいものであった。つまり、 $\alpha$ GDHは、CyGDHと同様に、グルコースセンサ用の酵素として有用なものであることが確認された。

## 【0009】

従来、このように有用な酵素2種を製造する際には、発現菌株の取得、培養および精製を、それぞれ別個に行う必要があり、製造コスト、効率の面で不利であった。

## 【0010】

## 【発明の開示】

本発明は、たとえばグルコースセンサなどに応用し得る2種類のGDHを効率



良く製造することを目的としている。

#### 【0011】

本発明に係るグルコース脱水素酵素の製造方法は、配列番号1に記載するグルコース脱水素活性を有する $\alpha$ サブユニットおよび電子伝達タンパク質である $\beta$ サブユニットをコードする配列を含むDNAを、シュードモナス属に属する微生物に導入して形質転換体を形成し、この形質転換体を培養して、前記 $\beta$ サブユニットを含む第1のグルコース脱水素酵素と、前記 $\beta$ サブユニットを含まない第2のグルコース脱水素酵素とを産生させることを特徴としている。

#### 【0012】

前記 $\alpha$ サブユニットは、たとえば還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約60kDaである。一方、前記 $\beta$ サブユニットは、たとえば還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約43kDaである。

#### 【0013】

前記DNAは、たとえば還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量が約14kDaである $\gamma$ サブユニットをコードする塩基配列を含んでいる。この場合、前記第1および第2グルコース脱水素酵素は、前記 $\gamma$ サブユニットを含んだものとして産生される。

#### 【0014】

前記シュードモナス属に属する微生物としては、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・アエルギノーサなどが挙げられるが、組み換え体の安全性の面からシュードモナス・プチダを使用するのが好ましい。

#### 【0015】

前記DNAは、たとえばブルクホルデリア属に属する微生物であって、グルコース脱水素活性を有する酵素を産生する能力を有する微生物から取得することができる。本発明で採用されるブルクホルデリア属に属する微生物は、本酵素の生産能を有するブルクホルデリア属に属する微生物であれば特に制限されないが、ブルクホルデリア・セパシア、特にブルクホルデリア・セパシアKS1株（以下、単に「KS1株」という）が好ましい。

## 【0016】

このK S 1株は、本発明者らが 温泉付近の土壌から分離した新規菌株であり、その菌学的性質からブルクホルデリア・セパシアと同定され、K S 1株と命名された。このK S 1株は、平成12年9月25日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に微生物受託番号第F E R M B P-7306として寄託されている。

## 【0017】

なお、本発明者らはK S 1株以外の株について、財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka, IFO) 又は理化学研究所微生物系統保存施設 (Japan Collection of Microorganisms, JCM) に寄託されている同ブルクホルデリア・セパシアのいくつかの菌株を取り寄せてグルコース脱水素酵素活性を測定したところ、いずれの菌株にも活性があることを確認している。したがって、本発明で使用されるDNAを取得するための微生物としては、K S 1株以外のブルクホルデリア・セパシア、たとえばJCM5506、JCM5507、JCM2800、JCM2801、IFO15124、IFO14595を採用できる。

## 【0018】

前記DNAは、ブルクホルデリア・セパシア染色体のDNAから単離されるが、その塩基配列及び同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかとされているので、これらの配列に基づいて化学合成することによっても取得することができる。

## 【0019】

前記 $\alpha$ サブユニットとしては、たとえば配列番号3のアミノ酸配列、または配列番号3のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有しているものが採用される。この $\alpha$ サブユニットは、たとえば配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764~2380からなる塩基配列によりコードされる。したがって、本発明で使用するDNAとしては、上記塩基配列を有するものを使用するのが好ましい。

## 【0020】

前記 $\beta$ サブユニットとしては、たとえば配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有しているものが採用される。この $\beta$ サブユニットは、たとえば配列番号1のうち、塩基番号2386～3660の塩基配列によりコードされる。したがって、本発明で使用するDNAとしては、上記塩基配列を有するものを使用するのが好ましい。

#### 【0021】

前記 $\gamma$ サブユニットを $\alpha$ サブユニットとともに発現させると、 $\alpha$ サブユニットのみを発現させた場合に比べて高い酵素活性が得られることが早出によって確認されている。したがって、酵素活性の観点からは、 $\gamma$ サブユニットを発現させるのが好ましく、前記DNAにおいては、 $\gamma$ サブユニットの構造遺伝子は、 $\alpha$ サブユニットの上流域に含ませるのが好ましい。そうすれば、 $\alpha$ サブユニットを産生する際に、先ず $\gamma$ サブユニットが発現されてタンパク質として存在することにより微生物体内で効率良く $\alpha$ サブユニットを産生することができると考えられる。

#### 【0022】

前記 $\gamma$ サブユニットとしては、たとえば配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を有しているものが採用される。この $\gamma$ サブユニットは、たとえば配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～761からなる塩基配列によりコードされる。したがって、本発明で使用するDNAとしては、上記塩基配列を有するものを使用するのが好ましい。

#### 【0023】

配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号2386以降の塩基配列は、 $\beta$ -サブユニットをコードしていると推定されるが、塩基番号2386～2451の塩基配列は、 $\beta$ -サブユニットのシグナルペプチドをコードしていると推測される。同シグナルペプチドの推定されるアミノ酸配列は、配列番号4のアミノ酸番号1～22のアミノ酸配列である。

#### 【0024】

シグナルペプチドは、リボソームで合成されたタンパク質が内膜を通過してペリプラズム空間に分泌される際に必要なペプチドであるため、シグナルペプチドが存在すれば、菌体のペリプラズムもしくは培養上清中に含有するタンパク質量が増加する。したがって、前記DNAとしては、前記 $\beta$ サブユニットのシグナルペプチドの発現をコードする塩基配列を含んでいるものを使用するのが好ましい。

#### 【0025】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明に係るグルコース脱水素酵素の製造方法について、具体的に説明する。

#### 【0026】

前記グルコース脱水素酵素の製造方法では、たとえば $\alpha$ サブユニットおよび $\beta$ サブユニットの発現をコードするDNAを取得する第1工程と、このDNAを含む組み換えベクターを、シュドモナス属に属する微生物に導入して形質転換体を形成する第2工程と、この形質転換体を培地にて培養し、 $\beta$ サブユニットを含むグルコース脱水素酵素（たとえばCyGDH）と、 $\beta$ サブユニットを含まないグルコース脱水素酵素（たとえば $\alpha$ GDH）と産生させる第3工程と、培地または微生物からグルコース脱水素酵素を採取する第4工程と、を含んでいる。

#### 【0027】

##### 第1工程（DNAの取得）：

DNAの取得にあたっては、まず組み換えベクターを構築する。組み換えベクターは、ブルクホルデリア属に属する微生物（たとえばブルクホルデリア・セバシアKS1株）から染色体DNAを分離・精製した後、この染色体DNAを切断した染色体DNA断片またはPCRなどにより増幅させたDNA断片と、リニアな発現ベクターとを結合閉鎖させることにより構築される。

#### 【0028】

染色体DNAの分離・精製は、微生物を溶菌して得られる溶菌物に基づいて行われる。溶菌の方法としては、たとえばリゾチームなどの溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム（SDS）などの界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理の

ような物理的破碎方法とを組み合わせてもよい。一方、溶菌物からのDNAの分離・精製は、たとえばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

#### 【0029】

染色体DNAの切断は、常法にしたがい、たとえば超音波処理や制限酵素処理を用いて行うことができる。制限酵素としては、たとえば特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素を用いられる。染色体DNA断片と発現ベクターとの結合は、たとえばDNAリガーゼを用いて行われる。

#### 【0030】

発現ベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組み換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、たとえば後述するエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、Lambda gt10、Lambda gt11などが例示される。一方、プラスミドとしては、たとえば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pTrc99A、pBluescriptあるいはコスミドであるSuperCosIなどが例示される。また、シュードモナスを用いる場合には、グラム陰性菌用広宿主域ベクターであるRSF1010、pBBR122、pCN51などが例示される。

#### 【0031】

次いで、組み換えベクターにマーカーを施して、この組み換えベクターを宿主微生物に移入して形質転換体を形成する。この形質転換体から、ベクターのマーカーと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、GDHをコードする遺伝子を含む組み換えベクターを保持する遺伝子供与微生物を得る。

#### 【0032】

宿主微生物としては、組み換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質を発現できるのであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリDH5 $\alpha$ 、XL-1BlueMRなどを用いることができる。宿主微生物に組み換えベクターを移入する方法としては、たとえば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレ

ーション法などを用いることができる。

#### 【0033】

さらに、遺伝子供与微生物を培養して、この微生物から組み換えベクターを分離・精製した後、組み換えベクターからGDHをコードする遺伝子（クローン化断片）を採取する。クローン化断片の採取は、染色体DNAを採取するのと同様な手法により行うことができる。

#### 【0034】

このクローン化断片は、グルコース脱水素活性を有する $\alpha$ サブユニットと、電子伝達タンパク質である $\beta$ サブユニットをコードする塩基配列を有している。ブルクホルデリア・セバシアKS1株から目的DNAを得る場合には、クローン化断片は、 $\alpha$ サブユニットや $\beta$ サブユニット（ $\beta$ サブユニットのシグナルペプチドを含む）をコードする塩基配列に加えて、 $\gamma$ サブユニットをコードする塩基配列を含むものとして得られる。なお、クローン化断片が $\alpha$ サブユニットや $\beta$ サブユニットをコードしていることは、あるいは $\gamma$ サブユニットをコードしていることは、このクローン化断片の塩基配列を常法により解読することによって確認することができる。

#### 【0035】

##### 第2工程（形質転換体の形成）：

目的とするDNA含有する形質転換体は、第1工程において得られたクローン化断片をベクターに組み込んだ後、シュードモナス属に属する微生物に導入することにより形成される。シュードモナス属に属する微生物としては、たとえばシュードモナス・プチダが好ましく使用される。宿主微生物への組み換えベクターの導入方法は、第1工程におけるスクリーニングの際の形質転換体の形成と同様な手法により行うことができる。

#### 【0036】

##### 第3工程（形質転換体の培養およびGDHの産生）：

第2工程において得られた形質転換体は、GDHを産生させるべく培養される。この形質転換体からは、 $\beta$ サブユニットを含むGDHと $\beta$ サブユニットを含まないGDHが同時に産生される。たとえば、ブルクホルデリア・セバシアKS1

株から目的とするDNAを得た場合には、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットを有するC $\gamma$ GDHと、 $\alpha$ 、 $\gamma$ サブユニットを有する $\alpha$ GDHとが同時に産生される。

#### 【0037】

形質転換体の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

#### 【0038】

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては、資化可能な炭素化合物であればよく、たとえばグルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては、資化可能な窒素化合物であればよく、たとえばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他に、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

#### 【0039】

培養温度は、菌が生育し、菌がGDHを産生する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20～42℃程度である。培養は、GDHが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に完了すればよく、通常は培養時間が12～72時間程度とされる。培地のpHは、菌が発育し、菌がGDHを産生する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH5.0～9.0程度の範囲である。

#### 【0040】

#### 第4工程（GDHの採取）：

GDHの採取は、一般には、常法に従って、培養液や菌からGDH含有溶液を分離した後、このGDH含有溶液を精製することにより行われる。

#### 【0041】

GDH含有溶液は、GDHが菌体内に存在する場合には、ろ過または遠心分離などの手段により培養液から菌体を採取した後、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、必要に応じてEDTAなどのキレート剤及

び界面活性剤を添加してGDHを可溶化することにより得ることができる。一方、GDHが菌体外（培養液中）に存在する場合には、ろ過または遠心分離などの手段により培養液と菌体とを分離することにより得ることができる。

#### 【0042】

GDH含有溶液の精製は、この溶液から直ちに行うこともできるが、この溶液中のGDHを濃縮した後に行うこともできる。濃縮は、たとえば減圧濃縮、膜濃縮、塩析処理、あるいは親水性有機溶媒（たとえばメタノール、エタノール、アセトン）による分別沈殿法により行うことができる。GDHの濃縮には、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。濃縮液の精製は、たとえばゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって行うことができる。これにより、 $\beta$ サブユニットを含むGDHと $\beta$ サブユニットを含まないGDHとを個別に得ることができる。

#### 【0043】

このようにして得られた精製酵素は、たとえば凍結乾燥、真空乾燥、スプレードライにより粉末化して市場に流通させることができる。

#### 【0044】

##### 【実施例】

以下においては、上述した製造方法の具体的な例について説明するとともに、この例により2種類のGDHが得られることについて実証する。

#### 【0045】

ブルクホルデリア・セパシアKS1株からの染色体DNAの調製:

ブルクホルデリア・セパシアKS1株からの染色体DNAは、常法に従って調製した。すなわち、まず、KS1株をTL液体培地(ポリペプトン=10g、酵母抽出液=1g、NaCl=5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=2g、グルコース=5g;全量1L、pH 7.2)を用いて、34℃で一晩振盪した。増殖した菌体は、遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100  $\mu$ g/mLのプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。この懸濁液に等量のフ



エノールクロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。析出物をガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

#### 【0046】

##### 形質転換体の形成：

先に得た染色体DNAを鋳型として、PCR法によりGDHをコードする遺伝子全長を増幅した。プライマーは、GDHの $\gamma$ サブユニットのN末端部の配列、およびGDHの $\beta$ サブユニットのC末端部の配列を用いた。このDNA断片を各プライマーの端に位置する制限酵素認識部位で切断した断片、およびtrcプロモータを含むDNA断片を調整し、広宿主域ベクターRSF1010と結合した後、大腸菌JM109に導入し、ストレプトマイシン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むLB寒天培地でコロニーを形成させた。生じたコロニーからプラスミドを調整し、これを鋳型として、前記PCRプライマーを用いたPCRによって、約3.4Kbの断片が増幅されるクローンを選択し、これを、シュードモナス・プチダATCC47054株に導入することにより、目的とする形質転換体（GDH発現菌株）を得た。

#### 【0047】

##### 形質転換体の培養およびGDHの産生：

形質転換体の培養は、好氣的培養条件で行った。より具体的には、形質転換体の培養は、培養液1L当たりの組成が表1となるように調整された培地7Lを用いて、 $34^{\circ}\text{C}$ で8時間行った。本培養液7Lを $4^{\circ}\text{C}$ 、10分間、 $9,000\times g$ で遠心分離することにより菌体を得た。

#### 【0048】

【表 1】

培地組成

ポリペプトン	10 g
酵母抽出液	1 g
NaCl	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
グルコース	5 g
ストレプトマイシン	0.05 g
Einol (ABLE Co. 東京 日本)	0.14 g
Total、蒸留水	1 L
pH調製	7.2

## 【0049】

GDHの精製:

得られた菌体を10 mMのリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) に分散させた状態で、フレンチプレス (大竹製作所 東京 日本) で1,500 Kg/cm<sup>2</sup>の圧力差を加えて破壊した。このときに得られた細胞抽出液を8,000×gで10分間、遠心分離し、細胞固形物を除いた。

## 【0050】

得られた粗酵素溶液は、最終濃度が1%になるようにTriton-X100を添加した。そして、4℃で一晩ゆっくり攪拌した。次に超遠心 (4℃、69800×g、90分間) した後に再遠心 (4℃、15000×g、15分間) し、上清として可溶化フラクションを得た。

## 【0051】

その可溶化フラクションを0.2% Triton-X100を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) で透析した後、その溶液を、0.2% Triton-X100を含む10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) で等量化されたQ-Sepharose FFカラム (22 mm ID×20 cm アマシャムバイオサイエンス) に供給した。タンパク質を、10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) 中のNaClの濃度が0~500 mMになるように、直線的グラジエントで溶出した。その流速は5 mL/minで行った。

## 【0052】

溶出液については、各フラクション毎にGDH活性を測定した。その結果を、図1に模式的に表した。図1から分かるように、グラジエントをかけた範囲において2つの大きなピークが確認された。

#### 【0053】

GDHの活性測定は、グルコースの脱水素化に基づく、電子受容体の還元反応を追跡することにより行った。電子受容体としては、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)及びフェナンジメトサルフェート(PMS)を用いた。反応はポリエチレンチューブ内で所定の温度で実施した。

#### 【0054】

まず、0.75mMPMSと0.75mMDCIP含有25mMトリスHCl緩衝液(pH8.0)20 $\mu$ Lに酵素溶液5 $\mu$ Lを添加して混合液を準備した。この混合液は、事前に1分間定温放置した。混合液に2Mグルコース1 $\mu$ L(最終濃度:77mM)を添加して反応を開始させ、2分間定温放置した。次に、氷冷蒸留水100 $\mu$ Lまたは7.5M尿素120 $\mu$ Lを添加して試料を冷却した。この試料について、超微量計測用セル(100 $\mu$ L)及びこれを用いて計測できる分光光度計(UV160、島津製作所、京都、日本)を用いて、DCIP還元にもとづく退色を経時的に計測した。測定波長は、DCIPの吸収波長である600nmとした。DCIPのモル吸光係数は22.23mM $\times$ cm $^{-1}$ とした。酵素1単位(U)は標準検定条件下で1分ごとに1 $\mu$ Mグルコースを酸化する量と定義した。タンパク濃度はローリー法で測定した。

#### 【0055】

次いで、2つのGDH活性のピークについて、フラクションを別個に集め、0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0、4 $^{\circ}$ C)で一夜透析し、2種類のGDH溶液を調整した。

#### 【0056】

各々のGDH調整溶液について、DEAE-5PWカラム(8.0mmID $\times$ 7.5cm 東ソー、東京、日本)を用いて別個に精製した。カラムは、予め、0.2%Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で平衡化されている。タンパク質は、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)中のN

a C l の濃度が 0 ~ 4 0 0 m M になるようし、直線的グラジエントで、流速 1 m L / m i n で溶出させた。各々のクロマトグラフィーにおける G D H 活性が最も高いフラクションを集め、0.2 % Triton-X100 を含む 1 0 m M リン酸カリウム緩衝液 (p H 8.0) で、一夜脱塩し、2 種類の精製酵素 (以下、便宜上、「第 1 精製酵素」および「第 2 精製酵素」という) を得た。

#### 【0057】

##### 精製酵素のサブユニットの特定:

各精製酵素液を S D S - P A G E で電気泳動し、サブユニットの分子量を特定した。S D S - P A G E は Tris-Tricine 緩衝液を用いて 8 - 2 5 % ポリアクリルアミドの勾配ゲル中で実施した。そのゲルのタンパク質はクマシー染色を行った。Phast System (Pharmacia) により、分離と展開を自動的に行った。標準タンパクの相対移動度により分子質量を測定した。

#### 【0058】

S D S - P A G E 電気泳動の結果を図 2 に示した。図 2 においては、レーン 1 は分子量標準マーカートンパク質のクマシー染色を、レーン 2 は第 1 精製酵素のクマシー染色を、レーン 3 は第 2 精製酵素のクマシー染色をそれぞれ示している。同図から分かるように、第 1 精製酵素は、分子量が約 6 0 k D a、約 4 3 k D a、および約 1 4 k D a のタンパク質に分離した。したがって、第 1 精製酵素は、分子量が約 6 0 k D a の  $\alpha$  サブユニットと、分子量が約 4 3 k D a の  $\beta$  サブユニットと、分子量が約 1 4 k D a の  $\gamma$  サブユニットとが結合していることが示唆された。第 2 精製酵素は、分子量が約 6 0 k D a、および約 1 4 k D a のタンパク質に分離した。したがって、第 2 精製酵素は、分子量が約 6 0 k D a の  $\alpha$  サブユニットと、分子量が約 1 4 k D a の  $\gamma$  サブユニットとが結合していることが示唆された。S D S - P A G E 電気泳動の結果は、第 1 精製酵素と第 2 精製酵素とが異なる G D H であり、2 種類の G D H が同時に生成されたことを示している。

#### 【0059】

電気泳動によって得られた  $\alpha$  サブユニット、 $\beta$  サブユニットを含むバンドをそれぞれ切り取り、ポリビニリデンフルオリド膜に転写した後、アミノ酸シーケンサー (島津製作所製、P P S Q - 1 0) によりアミノ酸配列を解析した。

### 【0060】

$\alpha$  サブユニットについては、配列番号3のアミノ酸配列においてアミノ酸番号2～12からなる11残基から構成されるペプチド配列を含むことが確認された。一方、 $\beta$  サブユニットについては、配列番号5に示すN末端の16残基のアミノ酸配列を確認することができた。

### 【0061】

組み換えベクターの分析:

G D H活性を有するシュードモナス・プチダの形質転換体から、目的組み換えベクターを抽出した。この組み換えベクターの挿入DNA断片について、常法により塩基配列を決定した。その結果、配列番号258～3660の塩基配列を含んでいた。

### 【0062】

国際公開WO02/36779号公報などに開示されているように、 $\alpha$  サブユニットをコードする塩基配列は、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380、 $\beta$  サブユニットをコードする塩基配列は、配列番号1のうち、塩基番号2386～3660、 $\gamma$  サブユニットをコードする塩基配列は、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～761、 $\beta$  サブユニットのシグナルペプチドをコードする塩基配列は、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号2386～2451の塩基配列である。

### 【0063】

したがって、目的組み換えベクターは、 $\alpha$  サブユニット、 $\beta$  サブユニット（ $\beta$  サブユニットのシグナルペプチドを含む）、 $\gamma$  サブユニットをコードする塩基配列を含んでいることが確認された。なお、各塩基配列に対応するアミノ酸配列は、 $\alpha$  サブユニットについては配列番号3、 $\beta$  サブユニットについては配列番号5、 $\gamma$  サブユニットについては配列番号2、 $\beta$  サブユニットのシグナルペプチドについては配列番号4のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号1～22に示してある。

### 【0064】

#### 【発明の効果】

本発明では、たとえば $\alpha$  G D HとC y G D Hといったように、2種類のG D H

を同時に、しかも効率よく製造することができる。

【 0 0 6 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SODE, Koji  
ARKRAY, INK.  
UNITIKA LTD.

<120> グルコース脱水素酵素の製造方法

<130> P14-294830

<160> 5

<210> 1

<211> 3706

<212> DNA

<213> *Burkholderia cepacia*

<220>

<221> CDS

<222> (258)..(761)

<220>

<221> CDS

<222> (764)..(2380)

<220>

<221> CDS

<222> (2386)..(3660)

<400> 1

```

aagctttctg tttgattgca cgcgattcta accgagcgtc tgtgaggcgg aacgcgacat 60
gcttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggctgatcgt 120
tacgaatggc tgacacattg aatggactat aaaaccattg tccgttccgg aatgtgcgcg 180
tacatttcag gtccgcgccg atttttgaga aatatcaagc gtggttttcc cgaatccggt 240
gttcgagaga aggaaac atg cac aac gac aac act ccc cac tcg cgt cgc 290
      Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg
            1             5             10
cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa 338
His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln
            15             20             25
ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tcg ctg aca ttg 386
Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu
            30             35             40
cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg 434
Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met
            45             50             55
acg ctt tcc gaa tcg ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc 482
Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile
            60             65             70             75
ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tcg ttc aag acg gcc 530
Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala
            80             85             90
gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc gcg tcc ggt tcg ctg acg 578
Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr
            95             100             105
cct gaa cag gaa tcg ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc 626

```

Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu  
 110 115 120  
 ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc 674  
 Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe  
 125 130 135  
 ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tcg tat tgc ccc aac aaa 722  
 Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys  
 140 145 150 155  
 ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc 769  
 Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala  
 160 165 170  
 gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtt gga tcg ggt gtc 817  
 Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val  
 175 180 185  
 gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg 865  
 Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val  
 190 195 200  
 atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag 913  
 Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu  
 205 210 215  
 cgc ttc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg 961  
 Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro  
 220 225 230  
 tcg agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac 1009  
 Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr  
 235 240 245 250  
 ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc cgc gcg 1057  
 Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala  
 255 260 265



gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc ttc att 1105  
 Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile  
 270 275 280  
 ccg aac gac ttc aag atg aag agc gtg tac ggc gtc ggc cgc gac tgg 1153  
 Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp  
 285 290 295  
 ccg atc cag tac gac gat ctc gag ccg tac tat cag cgc gcg gag gaa 1201  
 Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Glu  
 300 305 310  
 gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg ggc ccc gag gaa gat ctg tac tcg ccg 1249  
 Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr Ser Pro  
 315 320 325 330  
 cgc aag cag ccg tat ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tcg ttc aac gag 1297  
 Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe Asn Glu  
 335 340 345  
 cag acc atc aag acg gcg ctg aac aac tac gat ccg aag ttc cat gtc 1345  
 Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe His Val  
 350 355 360  
 gtg acc gag ccg gtc gcg cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc cgc ccg 1393  
 Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro  
 365 370 375  
 act tgt tgc ggc aac aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc ggc gcg 1441  
 Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala  
 380 385 390  
 atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gaa cgc gcc ggc gcg 1489  
 Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ala  
 395 400 405 410  
 aag ctg atc gag aac gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc ccg gac 1537  
 Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly Pro Asp

415	420	425	
aag cgc atc gtc gcg gcg ctc tac aag gac aag acg ggc gcc gag cat			1585
Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala Glu His			
430	435	440	
cgc gtc gaa ggc aag tat ttc gtg ctc gcc gcg aac ggc atc gag acg			1633
Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile Glu Thr			
445	450	455	
ccg aag atc ctg ctg atg tcc gcg aac cgc gat ttc ccg aac ggt gtc			1681
Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn Gly Val			
460	465	470	
gcg aac agc tcg gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cat ccg ggc			1729
Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly			
475	480	485	490
acc ggc gtg tcg ttc tat gcg agc gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc			1777
Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly			
495	500	505	
ccg cag gag atg acg tcg ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc			1825
Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg			
510	515	520	
gcg acc gaa gcg gcg aag aag atc cac ctg tcg aac ctg tcg cgc atc			1873
Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile			
525	530	535	
gac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc			1921
Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro			
540	545	550	
gac gag ctc gac gcg cag atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag			1969
Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln			
555	560	565	570
ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg			2017

Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val  
575 580 585  
ccg agc aag acg gcg acc gat gcg atc ggc att ccg cgc ccc gag atc 2065  
Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile  
590 595 600  
acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc gcc gcg cat acg cgc 2113  
Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg  
605 610 615  
gag gtc tac gcg acc gcc gcg aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg 2161  
Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val  
620 625 630  
ttc aac gac gaa ttc gcg ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc 2209  
Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile  
635 640 645 650  
atg ggc gcc gat gcg cgc gac tcc gtc gtc gac aag gac tgc cgc acg 2257  
Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr  
655 660 665  
ttc gac cat ccg aac ctg ttc att tcg agc agc gcg acg atg ccg acc 2305  
Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met Pro Thr  
670 675 680  
gtc ggt acc gta aac gtg acg ctg acg atc gcc gcg ctc gcg ctg cgg 2353  
Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala Leu Arg  
685 690 695  
atg tcg gac acg ctg aag aag gaa gtc tgacc gtg cgg aaa tct act ctc 2403  
Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val Val Arg Lys Ser Thr Leu  
700 705 710  
act ttc ctc atc gcc ggc tgc ctc gcg ttg ccg ggc ttc gcg cgc gcg 2451  
Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly Phe Ala Arg Ala  
715 720 725

gcc gat gcg gcc gat ccg gcg ctg gtc aag cgc ggc gaa tac ctc gcg 2499  
 Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala  
 730 735 740 745  
 acc gcc atg ccg gta ccg atg ctc ggc aag atc tac acg agc aac atc 2547  
 Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile  
 750 755 760  
 acg ccc gat ccc gat acg ggc gac tgc atg gcc tgc cac acc gtg aag 2595  
 Thr Pro Asp Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met Ala Cys His Thr Val Lys  
 765 770 775  
 ggc ggc aag ccg tac gcg ggc ggc ctt ggc ggc atc ggc aaa tgg acg 2643  
 Gly Gly Lys Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly Gly Ile Gly Lys Trp Thr  
 780 785 790  
 ttc gag gac ttc gag cgc gcg gtg cgg cac ggc gtg tcg aag aac ggc 2691  
 Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val Arg His Gly Val Ser Lys Asn Gly  
 795 800 805  
 gac aac ctg tat ccg gcg atg ccg tac gtg tcg tac gcg aag atc aag 2739  
 Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val Ser Tyr Ala Lys Ile Lys  
 810 815 820 825  
 gac gac gac gta cgc gcg ctg tac gcc tac ttc atg cac ggc gtc gag 2787  
 Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr Phe Met His Gly Val Glu  
 830 835 840  
 ccg gtc aag cag gcg ccg ccg aag aac gag atc cca gcg ctg cta agc 2835  
 Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu Ile Pro Ala Leu Leu Ser  
 845 850 855  
 atg cgc tgg ccg ctg aag atc tgg aac tgg ctg ttc ctg aag gac ggc 2883  
 Met Arg Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp Leu Phe Leu Lys Asp Gly  
 860 865 870  
 ccg tac cag ccg aag ccg tcg cag agc gcc gaa tgg aat cgc ggc gcg 2931  
 Pro Tyr Gln Pro Lys Pro Ser Gln Ser Ala Glu Trp Asn Arg Gly Ala

875	880	885	
tat ctg gtg cag ggt ctc gcg cac tgc agc acg tgc cac acg ccg cgc	2979		
Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala His Cys Ser Thr Cys His Thr Pro Arg			
890	895	900	905
ggc atc gcg atg cag gag aag tcg ctc gac gaa acc ggc ggc agc ttc	3027		
Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp Glu Thr Gly Gly Ser Phe			
910	915	920	
ctc gcg ggg tcg gtg ctc gcc ggc tgg gac ggc tac aac atc acg tcg	3075		
Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp Gly Tyr Asn Ile Thr Ser			
925	930	935	
gac ccg aat gcg ggg atc ggc agc tgg acg cag cag cag ctc gtg cag	3123		
Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr Gln Gln Gln Leu Val Gln			
940	945	950	
tat ttg cgc acc ggc agc gtg ccg ggc gtc gcg cag gcg gcc ggg ccg	3171		
Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val Ala Gln Ala Ala Gly Pro			
955	960	965	
atg gcc gag gcg gtc gag cac agc ttc tcg aag atg acc gaa gcg gac	3219		
Met Ala Glu Ala Val Glu His Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp			
970	975	980	985
atc ggt gcg atc gcc acg tac gtc cgc acg gtg ccg gcc gtt gcc gac	3267		
Ile Gly Ala Ile Ala Thr Tyr Val Arg Thr Val Pro Ala Val Ala Asp			
990	995	1000	
agc aac gcg aag cag ccg cgg tcg tcg tgg ggc aag ccg gcc gag gac	3315		
Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser Ser Trp Gly Lys Pro Ala Glu Asp			
1005	1010	1015	
ggg ctg aag ctg cgc ggt gtc gcg ctc gcg tcg tcg ggc atc gat ccg	3363		
Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala Ser Ser Gly Ile Asp Pro			
1020	1025	1030	
gcg cgg ctg tat ctc ggc aac tgc gcg acg tgc cac cag atg cag ggc	3411		

Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr Cys His Gln Met Gln Gly  
 1035 1040 1045  
 aag ggc acg ccg gac ggc tat tac ccg tgc ctg ttc cac aac tcc acc 3459  
 Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser Leu Phe His Asn Ser Thr  
 1050 1055 1060 1065  
 gtc ggc gcg tgc aat ccg tgc aac ctc gtg cag gtg atc ctg aac ggc 3507  
 Val Gly Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val Gln Val Ile Leu Asn Gly  
 1070 1075 1080  
 gtg cag cgc aag atc ggc agc gag gat atc ggg atg ccc gct ttc cgc 3555  
 Val Gln Arg Lys Ile Gly Ser Glu Asp Ile Gly Met Pro Ala Phe Arg  
 1085 1090 1095  
 tac gat ctg aac gac gcg cag atc gcc gcg ctg acg aac tac gtg acc 3603  
 Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Ala Leu Thr Asn Tyr Val Thr  
 1100 1105 1110  
 gcg cag ttc ggc aat ccg gcg gcg aag gtg acg gag cag gac gtc gcg 3651  
 Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val Thr Glu Gln Asp Val Ala  
 1115 1120 1125  
 aag ctg cgc tga catagtcggg cgccgccgaca cggcgcaacc gataggacag gag 3706  
 Lys Leu Arg  
 1130

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 168

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Pseudomonas putida

&lt;400&gt; 2

Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg His Gly Asp Ala Ala

1

5

10

15

Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln Gly Ala Leu Ala Leu  
                     20                                    25                                    30  
 Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu Arg Ala Leu Ala Asp  
                     35                                    40                                    45  
 Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met Thr Leu Ser Glu Ser  
                     50                                    55                                    60  
 Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile Gly Glu Arg Leu Leu  
                     65                                    70                                    75                                    80  
 Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala Asp Ser Leu Pro Gln  
                                     85                                    90                                    95  
 Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr Pro Glu Gln Glu Ser  
                                     100                                    105                                    110  
 Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu Gly Ile Val Asp Asn  
                                     115                                    120                                    125  
 Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe Gly Val Val Ser Asp  
                                     130                                    135                                    140  
 Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys Pro Gly Phe Trp Ala  
                                     145                                    150                                    155                                    160  
 Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala  
                                     165

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 539

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Pseudomonas putida

&lt;400&gt; 3

Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser  
                     1                                    5                                    10                                    15  
 Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys

20	25	30	
Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile			
35	40	45	
Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro			
50	55	60	
Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn			
65	70	75	80
Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile			
85	90	95	
Arg Ala Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg			
100	105	110	
Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg			
115	120	125	
Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala			
130	135	140	
Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr			
145	150	155	160
Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe			
165	170	175	
Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe			
180	185	190	
His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly			
195	200	205	
Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile			
210	215	220	
Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala			
225	230	235	240
Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly			
245	250	255	



Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala  
 260 265 270  
 Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile  
 275 280 285  
 Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn  
 290 295 300  
 Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His  
 305 310 315 320  
 Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly  
 325 330 335  
 Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro  
 340 345 350  
 Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser  
 355 360 365  
 Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met  
 370 375 380  
 Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr  
 385 390 395 400  
 Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg  
 405 410 415  
 Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro  
 420 425 430  
 Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His  
 435 440 445  
 Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp  
 450 455 460  
 Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser  
 465 470 475 480  
 Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys

	485		490		495
Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met					
	500		505		510
Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala					
	515		520		525
Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val					
	530		535		

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 4

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu			
1	5	10	15
Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp			
	20	25	

<210> 5

<211> 425

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 5

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu Pro Gly			
Phe			
1	5	10	15
Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu			

Ala

20

25

30

35

Thr Ala Met Pro Val Pro Met Leu Gly Lys Ile Tyr Thr Ser Asn Ile Thr Pro  
Asp

40

45

50

55

Pro Asp Thr Gly Asp Cys Met Ala Cys His Thr Val Lys Gly Gly Lys Pro Tyr  
Ala

60

65

70

75

Gly Gly Leu Gly Gly Ile Gly Lys Trp Thr Phe Glu Asp Phe Glu Arg Ala Val  
Arg

80

85

90

95

His Gly Val Ser Lys Asn Gly Asp Asn Leu Tyr Pro Ala Met Pro Tyr Val Ser  
Tyr

100

105

110

Ala Lys Ile Lys Asp Asp Asp Val Arg Ala Leu Tyr Ala Tyr Phe Met His Gly  
Val

115

120

125

130

Glu Pro Val Lys Gln Ala Pro Pro Lys Asn Glu Ile Pro Ala Leu Leu Ser Met  
Arg

135

140

145

150

Trp Pro Leu Lys Ile Trp Asn Trp Leu Phe Leu Lys Asp Gly Pro Tyr Gln Pro  
Lys

155

160

165

170

Pro Ser Gln Ser Ala Glu Trp Asn Arg Gly Ala Tyr Leu Val Gln Gly Leu Ala  
His

175

180

185

190

Cys Ser Thr Cys His Thr Pro Arg Gly Ile Ala Met Gln Glu Lys Ser Leu Asp

Glu

195

200

205

Thr Gly Gly Ser Phe Leu Ala Gly Ser Val Leu Ala Gly Trp Asp Gly Tyr Asn  
Ile

210

215

220

225

Thr Ser Asp Pro Asn Ala Gly Ile Gly Ser Trp Thr Gln Gln Gln Leu Val Gln

230

235

240

245

Tyr Leu Arg Thr Gly Ser Val Pro Gly Val Ala Gln Ala Ala Gly Pro Met Ala  
Glu

250

255

260

265

Ala Val Glu His Ser Phe Ser Lys Met Thr Glu Ala Asp Ile Gly Ala Ile Ala  
Thr

270

275

280

Tyr Val Arg Thr Val Pro Ala Val Ala Asp Ser Asn Ala Lys Gln Pro Arg Ser  
Ser

285

290

295

300

Trp Gly Lys Pro Ala Glu Asp Gly Leu Lys Leu Arg Gly Val Ala Leu Ala Ser  
Ser

305

310

315

320

Gly Ile Asp Pro Ala Arg Leu Tyr Leu Gly Asn Cys Ala Thr Cys His Gln Met  
Gln

325

330

335

340

Gly Lys Gly Thr Pro Asp Gly Tyr Tyr Pro Ser Leu Phe His Asn Ser Thr Val  
Gly

345

350

355

360

Ala Ser Asn Pro Ser Asn Leu Val Gln Val Ile Leu Asn Gly Val Gln Arg Lys  
Ile

365                                      370                                      375  
 Gly Ser Glu Asp Ile Gly Met Pro Ala Phe Arg Tyr Asp Leu Asn Asp Ala Gln  
 Ile  
 380                                      385                                      390                                      395  
 Ala Ala Leu Thr Asn Tyr Val Thr Ala Gln Phe Gly Asn Pro Ala Ala Lys Val  
 Thr  
 400                                      405                                      410                                      415  
 Glu Gln Asp Val Ala Lys Leu Arg  
 420                                      425

【図面の簡単な説明】

【図 1】

形質転換体から取得した可溶化フラクションの Q-Sepharose F F クロマトグラフィーの結果を示すものである。

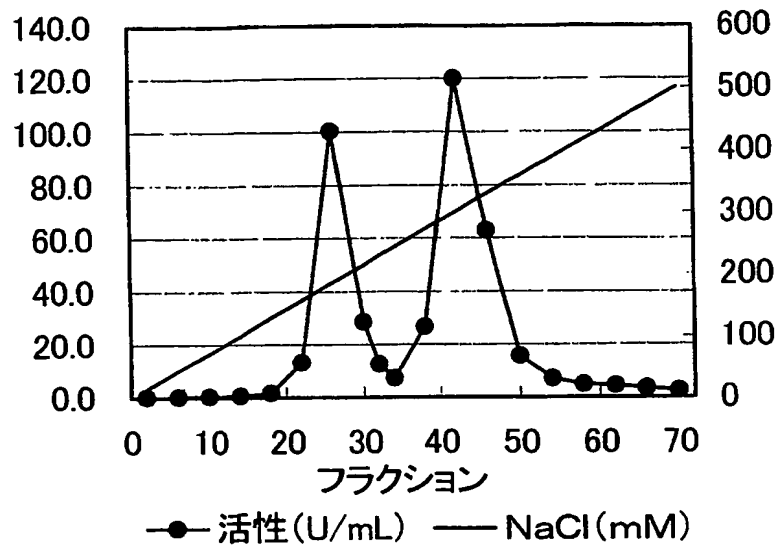
【図 2】

SDS-PAGE の結果を模式的に表したものである。

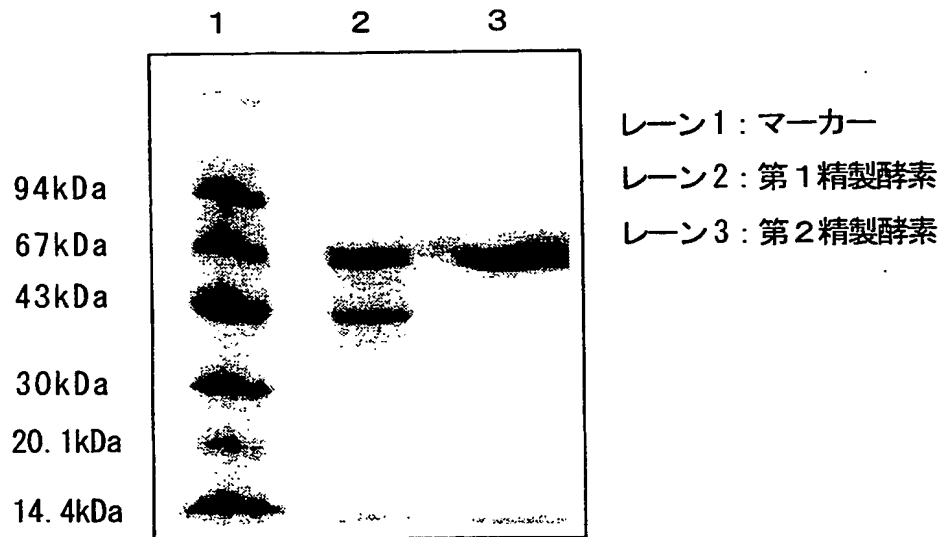
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、たとえばグルコースセンサなどに応用し得る 2 種類の GDH を効率良く製造することを課題としている。

【解決手段】 本発明に係るグルコース脱水素酵素の製造方法では、グルコース脱水素活性を有する  $\alpha$  サブユニットおよび電子伝達タンパク質である  $\beta$  サブユニットをコードする配列を含む DNA を、シュードモナス属に属する微生物に導入して形質転換体を形成し、この形質転換体を培養して、前記  $\beta$  サブユニットを含む第 1 のグルコース脱水素酵素と、前記  $\beta$  サブユニットを含まない第 2 のグルコース脱水素酵素とを産生させる。

【選択図】 なし

特願 2002-253752

出願人履歴情報

識別番号

[596153357]

1. 変更年月日

1996年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都目黒区南1-13-16

氏 名

早出 広司



特願 2002-253752

出願人履歴情報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日

2000年 6月12日

[変更理由]

名称変更

住所

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏名

アークレイ株式会社

特願 2 0 0 2 - 2 5 3 7 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 4 5 0 3 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]  
住 所  
氏 名

1 9 9 0 年 8 月 7 日  
新規登録  
兵庫県尼崎市東本町 1 丁目 5 0 番地  
ユニチカ株式会社